



PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international

DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 1/06	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/37750
		(43) Date de publication internationale: 29 juillet 1999 (29.07.99)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/00105</p> <p>(22) Date de dépôt international: 20 janvier 1999 (20.01.99)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 98/00815 21 janvier 1998 (21.01.98) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PASTEUR MERIEUX SERUMS ET VACCINS [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR).</p> <p>(72) Inventeur; et (75) Inventeur/Déposant (US seulement): CHEVALIER, Michel [FR/FR]; 19, rue de la Guillotière, F-38270 Beurepaire (FR).</p> <p>(74) Mandataire: AYROLES, Marie-Pauline; Pasteur Mérieux Sérums et Vaccins, 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasién (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée Avec rapport de recherche internationale.</p>

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR CELL LYSIS

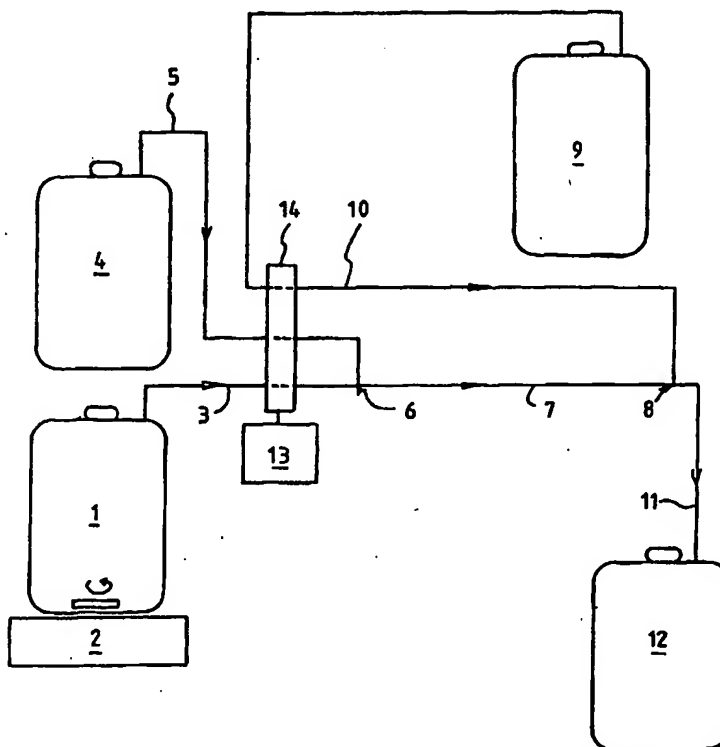
(54) Titre: PROCÉDE ET DISPOSITIF DE LYSE CELLULAIRE

(57) Abstract

The invention concerns a method and a device for cell lysis which consists in continuously producing a liquid mixture of bacteria or eukaryotic cells and a lysis agent, and in immediately causing said mixture to flow in a constant flux inside a pipe (7), the flow rate of said flux being adapted, according to the pipe (7) length and diameter, so as to obtain a substantially homogeneous lysate at said pipe (7) outlet.

(57) Abrégé

Procédé et dispositif de lyse cellulaire dans lequel on réalise, en continu, un mélange liquide de bactéries ou de cellules eucaryotes et d'un agent de lyse, et l'on fait immédiatement écouler ce mélange dans un flux constant à l'intérieur d'une canalisation (7), le débit de ce flux étant adapté, en fonction du diamètre et de la longueur de la canalisation (7), de manière à obtenir un lysat cellulaire sensiblement homogène à la sortie (8) de ladite canalisation.



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PL	Pologne		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	PT	Portugal		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SD	Soudan		
DK	Danemark	LR	Libéria	SE	Suède		
EE	Estonie			SG	Singapour		

Procédé et dispositif de lyse cellulaire

La présente invention a trait à un procédé et un dispositif de lyse de bactéries ou de cellules eucaryotes, ainsi que d'extraction et de purification d'acides nucléiques, et notamment de plasmides, à partir de bactéries ou de cellules eucaryotes contenant ces plasmides.

L'obtention de plasmides d'intérêt, et notamment de plasmides dans lesquels ont été insérés un gène ou une séquence codante d'ADN, est effectuée par multicopie de ces plasmides dans des bactéries aptes à produire un grand nombre de ces plasmides, et notamment dans certaines souches d'*Escherichia coli* hautement productives de plasmides et souvent déjà utilisées en laboratoire ou à l'échelle industrielle.

L'une des applications qui demande une production importante d'un plasmide, à l'échelle industrielle, est la fabrication de médicaments ou vecteurs d'intérêt prophylactique ou thérapeutique à base d'un plasmide nu ou associé à des moyens de pénétration dans les cellules de l'hôte receveur. De telles applications sont décrites par exemple dans la demande de brevet WO 90/11092.

Il existe plusieurs techniques de lyse bactérienne permettant l'extraction des plasmides, suivie d'une séparation, et donc d'une purification de ces plasmides. La technique la plus couramment utilisée est la technique de lyse alcaline qui met en œuvre un agent de lyse alcalin tel qu'une préparation soude + SDS (dodécylsulfate de sodium), suivie d'une neutralisation par un agent acide, tel que de l'acétate de potassium. Cet agent de neutralisation a aussi pour effet de précipiter l'ensemble des constituants bactériens, dont l'ADN génomique, le surnageant contenant essentiellement l'ADN plasmidique. Le surnageant peut ensuite être séparé du précipitât par centrifugation ou filtration (Birnboim Methods in Enzymology (1983) 100 : 243). La technique de lyse alcaline est tout particulièrement recommandée pour lyser des bactéries ; mais elle peut tout aussi bien être utilisée pour lyser des cellules eucaryotes.

Cette technique, qui convient à l'échelle du laboratoire, est pénible à mettre en œuvre à l'échelle industrielle car le lysat résultant de l'action de l'agent alcalin sur les bactéries constitue une suspension très visqueuse, de

sorte que le lysat en train de se former doit être homogénéisé par agitation. De même, après neutralisation à l'acide, une homogénéisation par agitation est nécessaire.

Cette agitation est délicate et elle est effectuée généralement de façon manuelle, l'opérateur agitant doucement les bouteilles ou flacons contenant le milieu de lyse. Une agitation insuffisante procure une lyse de mauvaise qualité alors qu'une agitation excessive tend à morceler l'ADN génomique, qui se mélange par la suite aux plasmides. Dans les deux cas, on observe une diminution du rendement en ADN plasmidique. En conséquence, le tour de main de l'opérateur est un gage essentiel de réussite de l'opération.

Afin d'automatiser le procédé de lyse, on a déjà proposé, dans le document WO 97/23601, de faire passer, en continu, la suspension de cellules à lyser et une solution d'un agent de lyse à travers un mélangeur statique d'une longueur suffisante pour parachever la lyse. Le lysat qui en résulte peut ensuite être amené, par une canalisation, à un second mélangeur statique dans lequel pénètre également une solution d'un agent précipitant.

Un tel procédé met donc en œuvre un moyen spécifique, à savoir un mélangeur statique, qui remplace l'agitation manuelle de volumes importants par une agitation continue sur toute la longueur du mélangeur. L'utilisation d'un tel mélangeur, outre qu'elle demande l'achat, l'entretien et le nettoyage du dispositif, impose une durée fixe de mise en contact avec l'agent de lyse, sans possibilité pratique de la contrôler ou de la moduler. De plus, l'agitation entretenue dans le mélangeur, même si elle est préférable à l'agitation mal contrôlée de volumes discontinus, peut provoquer des cassures dans, ou des dégradations de constituants cellulaires et notamment d'acides nucléiques.

Un autre procédé, décrit par exemple dans le document WO 96/36106, permet également d'établir une lyse en continu, mais cette fois sans utiliser de moyens d'agitation. Ce procédé consiste (i) à préparer un mélange d'une suspension bactérienne et d'un agent, tel que du lysozyme, à laisser incuber ce mélange pendant environ une heure afin de fragiliser la paroi bactérienne, puis (ii) à faire passer un flux de ce mélange à l'intérieur d'une canalisation chauffée à forte température (70-100°C). L'action de la chaleur favorise la lyse. L'inconvénient d'une telle solution est de nécessiter un moyen de chauffage à

des températures élevées et une adaptation de la température aux différents cas particuliers que l'on peut rencontrer.

La présente invention se propose de remédier à ces inconvénients et de fournir un procédé de lyse cellulaire, applicable notamment à l'extraction et à la
5 purification d'acides nucléiques tels que des plasmides à partir de bactéries ou de cellules eucaryotes, qui soit susceptible d'être mis en œuvre sans intervention manuelle et dans des conditions extrêmement économiques.

Un autre objectif de l'invention est de fournir un procédé qui permet de contrôler de manière extrêmement précise les conditions et la durée de la lyse
10 et de l'extraction et ceci pour la totalité des cellules en présence.

Un autre objectif est de fournir un procédé permettant d'établir des conditions de lyse sensiblement homogène pour une population de cellules.

Un autre objectif est de fournir un procédé susceptible d'être mis en œuvre dans un milieu fermé, à l'abri des contaminations, ce qui est un
15 avantage pour la qualité pharmaceutique des produits recherchés, par exemple des plasmides.

Un autre objectif est d'obtenir une réduction de la durée du contact cellules / agent de lyse, qui est nécessaire pour parachever la lyse.

Un autre objectif est de fournir un dispositif pour la mise en œuvre de ce
20 procédé, dispositif simple et peu onéreux.

Un autre objectif est de fournir à l'échelle industrielle, des préparations plasmidiques avec un rendement élevé et sensiblement amélioré par rapport à celui des préparations pouvant être obtenues selon les procédés de l'art antérieur.

25 L'invention repose sur la découverte inattendue que l'on peut, moyennant le respect d'un certain nombre de paramètres, assurer une lyse homogène et contrôlée de cellules, et notamment de bactéries, par simple mélange en continu, dans une canalisation usuelle, d'une suspension de cellules avec un agent de lyse, malgré la viscosité importante attendue, sans utiliser aucun des
30 moyens de l'art antérieur tel qu'un mélangeur statique ou des températures élevées.

L'invention a donc pour objet un procédé de lyse cellulaire dans lequel on réalise, en continu, un mélange liquide de cellules et d'un agent de lyse, et l'on

fait immédiatement écouler ce mélange sous un flux constant, à l'intérieur d'une canalisation, le débit de ce flux étant adapté, en fonction du diamètre et de la longueur de la canalisation, de manière à obtenir un lysat cellulaire sensiblement homogène à la sortie de ladite canalisation.

5 L'obtention d'un lysat homogène se traduit par une forte chute de la turbidité et l'apparition d'un mélange transparent à l'œil.

De préférence, la canalisation présente un petit diamètre interne afin que le mélange se forme presque instantanément de manière homogène, sans qu'il se forme de veines liquides séparées. Ce diamètre peut être déterminé
10 expérimentalement. En général, un diamètre de l'ordre de 1 cm ou de préférence inférieur répond à cette définition, et l'on préfère un diamètre compris entre 2 et 8 mm.

On doit bien évidemment comprendre que si le diamètre et le débit du flux sont des éléments du procédé fixés à l'avance, on peut tout aussi bien adapter
15 la longueur de la canalisation de manière à obtenir l'effet recherché. Par exemple pour un diamètre et un débit donné du flux, il suffit de jouer sur la longueur de la canalisation e.g., en utilisant une simple canalisation souple que l'on coupe à la longueur désirée.

La longueur minimale de la canalisation à partir du point de rencontre de
20 la suspension cellulaire et de l'agent de lyse, qui est nécessaire de parcourir pour atteindre l'état de lyse, peut être facilement déterminée par simple observation au travers d'une canalisation transparente, de la diminution de la turbidité du mélange jusqu'à l'apparition d'un lysat transparent à l'œil. Une longueur de canalisation de l'ordre de 10 cm à quelques mètres est en général
25 convenable.

L'un des avantages de l'invention consiste dans l'homogénéité du mélange en cours de lyse (la durée de la lyse est sensiblement identique pour toutes les bactéries) ; ce qui permet d'obtenir *in fine* un lysat homogène. Ceci est réalisé par le choix convenable des paramètres de l'invention (diamètre, et
30 longueur de canalisation, débit du flux), sans avoir recours à des moyens d'agitation ou de chauffage.

De préférence, le mélange de cellules et d'agent de lyse est réalisé en introduisant, dans la susdite canalisation, un flux de cellules, par exemple d'une

suspension cellulaire, et un flux d'une solution d'agent de lyse, de sorte que l'écoulement du flux de ce mélange produit une homogénéisation rapide, qui est presque instantanée, si on utilise une canalisation de diamètre réduit.

L'agent de lyse peut être un agent chimique, par exemple un agent
5 alcalin, tel qu'une solution soude + SDS, de préférence un mélange NaOH 0,2 M / SDS 1 %. Ce peut être aussi une solution hypotonique par rapport au milieu cellulaire, destinée à provoquer un choc osmotique. Dans le cas où les bactéries sont simplement transférées dans une solution hypotonique, elles ont été traitées au préalable de manière à ce que leur paroi soit fragilisée, par un
10 agent tel que du lysozyme. Le traitement par un agent alcalin est particulièrement adapté à la lyse bactérienne, tandis que le traitement par une solution hypotonique convient tout particulièrement pour la lyse des cellules eucaryotes.

Dans le cas où l'on a utilisé un agent de lyse alcalin, on préfère ajouter au
15 lysat, un agent de neutralisation. En effet, l'ajout de cet agent permet d'arrêter l'action de dégradation liée à l'agent alcalin, une fois obtenue une lyse totale et homogène. Dans ce dernier cas, un autre avantage de l'invention réside dans l'exercice du contrôle de la durée pendant laquelle les cellules sont soumises à des conditions de pH fortement alcalines. Ceci permet de mettre très facilement
20 en œuvre les conditions de durée optimales aboutissant à une lyse totale et homogène en évitant de prolonger l'action de l'agent alcalin au-delà du temps nécessaire et suffisant pour parachever la lyse afin d'éviter toute action délétère en particulier sur l'ADN. L'agent neutralisant que l'on ajoute au lysat arrivant à l'extrémité de la canalisation peut être de préférence, de l'acétate de
25 sodium ou de potassium, par exemple de l'acétate de potassium 3 M. Il est avantageusement choisi de façon à obtenir un pH final proche de 5,5 grâce à l'addition d'HCl 12N.

D'autre part, si le but poursuivi *in fine* consiste *e.g.* à extraire des plasmides, il est souhaitable de séparer ces plasmides du reste des
30 constituants cellulaires. Cette séparation est réalisée en précipitant ces constituants cellulaires, y compris l'ADN génomique, en ajoutant au lysat un agent précipitant ; les plasmides restant alors dans le surnageant. Comme agent de précipitation, on peut utiliser l'acétate de sodium ou de potassium, par

exemple de l'acétate de potassium 3 M. Il est avantageusement choisi de façon à obtenir un pH final proche de 5,5 grâce à l'addition d'HCl 12N.

Un agent de précipitation tel que l'acétate de sodium ou de potassium, sert aussi d'agent de neutralisation, lorsque l'on met en œuvre la technique de lyse alcaline.

L'invention a également pour objet un procédé d'extraction et/ou de purification d'acides nucléiques, notamment de plasmides, à partir d'une suspension cellulaire, dans lequel (i) on met en œuvre le procédé de lyse selon l'invention afin d'obtenir un lysat cellulaire et, en continu du procédé de lyse, (i) on traite le lysat cellulaire par un agent précipitant et/ou neutralisant, afin d'obtenir une préparation comportant un surnageant contenant l'ADN plasmidique et une phase précipitée ou floculée contenant la majorité des éléments cellulaires y compris l'ADN génomique. Pour ce faire, de manière avantageuse, (i) on réalise, en continu, un mélange d'une suspension cellulaire et d'une préparation liquide (solution) d'un agent de lyse, en un premier point de rencontre déterminé, à partir duquel on établit un flux constant dudit mélange dans une canalisation, pour homogénéiser le mélange de la suspension et de l'agent de lyse, (ii) on maintient ce mélange dans ce flux constant pendant une durée déterminée, et à la fin de cette durée (iii) on ajoute, en un second point de rencontre déterminé, une solution d'un agent précipitant ; ladite durée étant déterminée par la distance séparant lesdits premier et second points de rencontre et par la vitesse de déplacement du mélange (ou débit linéaire) sur cette distance. Une fois la précipitation effectuée, on procède, d'une façon quelconque, à la séparation des plasmides restés dans la surnageant d'avec le reste des éléments cellulaires précipités ou floculés.

Ce procédé d'extraction plasmidique peut avantageusement être mis en œuvre de la façon suivante :

- (i) on établit un flux de la suspension cellulaire dans une première canalisation ;
- (ii) on établit un flux de l'agent de lyse en solution dans une deuxième canalisation qui se jette dans la première canalisation (ou vice-versa) en un premier point de rencontre pour former une troisième canalisation ;

- (iii) on établit un flux d'un agent précipitant dans une quatrième canalisation qui se jette dans la troisième canalisation (ou vice-versa) en un deuxième point de rencontre situé en aval du premier point de rencontre, pour former une cinquième canalisation ;
- 5 (iv) on établit un flux du mélange cellules/agent de lyse réalisé au premier point de rencontre, dans la troisième canalisation (comprise entre le premier et le deuxième point de rencontre) à un débit linéaire adapté en fonction du diamètre et de la longueur de la troisième canalisation, de manière à permettre l'homogénéisation du mélange et l'obtention d'un
- 10 lysat cellulaire sensiblement homogène au deuxième point de rencontre ; et
- (v) dans la cinquième canalisation, on établit un flux de la préparation obtenue au second point de rencontre, par mélange du lysat cellulaire avec l'agent de précipitation ; et
- 15 (vi) on récupère à la sortie de la cinquième canalisation une préparation comprenant un surnageant contenant l'ADN plasmidique et une phase précipitée ou floculée contenant la majorité des éléments cellulaires y compris l'ADN génomique.

Par la suite, on peut en outre procéder, de manière quelconque, à la

20 séparation du surnageant d'avec la phase précipitée ou floculée, de préférence en continu de l'étape (vi) de récupération.

Le tableau suivant indique à titre d'exemple diverses conditions expérimentales (longueur de canalisation, diamètre, débit, durée de mise en contact avec l'agent de lyse alcalin) qui permettent d'obtenir une lyse

25 bactérienne complète et homogène, par la technique de lyse alcaline. Les concentrations bactériennes et d'agent de lyse restent identiques d'un essai à l'autre.

Longueur de la Canalisation	Diamètre	Débit	Durée de mise en contact avec l'agent de lyse
28 cm	0,3 cm	160 ml/min	2 secondes
26 cm	0,7 cm	160 ml/min	15 secondes
85 cm + réservoir de 500 ml	0,7 cm	160 ml/min	4 minutes

Le temps nécessaire pour obtenir une lyse complète et homogène, compte tenu des proportions usuelles de suspension et d'agent de lyse peut être très substantiellement réduit et même inférieur à une ou plusieurs minutes, par exemple 5 min et même ramenée à des valeurs aussi faibles qu'une ou deux secondes, contrastant avec la dizaine de minutes nécessaire dans l'art antérieur.

On comprend également que l'on assure, grâce à l'invention, des conditions de lyse, de précipitation et/ou de neutralisation totalement homogènes dans le temps, sur l'ensemble de la suspension cellulaire que l'on fait couler à travers la canalisation.

La proportion des débits, et donc des volumes mélangés répond de préférence aux définitions suivantes :

- suspension bactérienne / agent de lyse (par exemple mélange soude + SDS) : comprise entre 1/4 et 3/4, et de préférence de l'ordre de 1/2,
- agent alcalin de lyse / agent acide neutralisant, de préférence acétate de potassium : comprise entre 1 et 2 et de préférence de l'ordre de 1,3.

De préférence la concentration de la suspension bactérienne est de l'ordre de 170 grammes (en poids humide de bactéries) / litre d'un tampon classique (par exemple Tris EDTA) + glucose.

De préférence, la suspension cellulaire est conservée à basse température et dirigée à cette même température dans la canalisation vers le point de rencontre avec l'agent de lyse, cette température étant de préférence de l'ordre de 4°C. L'agent de lyse peut être maintenu et véhiculé à température ambiante et l'agent précipitant et/ou neutralisant est de préférence maintenu à basse température, telle que 4°C.

L'invention a également pour objet un dispositif pour la mise en œuvre de ce procédé, caractérisé en ce qu'il comporte,

- à partir d'une source de suspension cellulaire, telle qu'un réservoir, une canalisation permettant l'établissement d'un flux de suspension cellulaire,
- 5 - à partir d'une source d'un agent de lyse telle qu'un réservoir, une deuxième canalisation permettant l'établissement d'un flux de l'agent de lyse, lesdites première et deuxième canalisations aboutissant à un premier point de rencontre dans lequel elles débouchent l'une dans l'autre,
- 10 - une troisième canalisation de petit diamètre et de longueur déterminée s'étendant à partir dudit premier point de rencontre,
- et des moyens, tels que des moyens de pompage, pour l'établissement des flux dans lesdites canalisations ;

la longueur, le diamètre et le débit dans ladite troisième canalisation étant
15 adaptés de manière à obtenir un mélange sensiblement homogène aboutissant à un lysat sensiblement homogène.

Le dispositif peut, en outre, comporter :

- à partir d'une source d'agent neutralisant et/ou précipitant, telle qu'un réservoir, une quatrième canalisation aboutissant à un second point de
20 rencontre à l'extrémité de ladite troisième canalisation de façon que les canalisations débouchent l'une dans l'autre, ladite troisième canalisation ayant une longueur déterminée par la distance entre ledit premier point de rencontre et ledit second point de rencontre ;
- à partir dudit second point de rencontre, une cinquième canalisation de
25 petit diamètre aboutissant à des moyens de récupération et/ou de séparation ; et
- et des moyens, tels que des moyens de pompage, pour l'établissement des flux dans lesdites quatrième et cinquième canalisations.

De préférence toutes les canalisations ont de petits diamètres tels que
30 définis précédemment.

Les petits diamètres desdites canalisations peuvent être identiques ou différents. Les différences de diamètre entre canalisations peuvent être déterminées par les moyens d'établissement des flux.

Les moyens d'établissement des flux peuvent avantageusement être des pompes, de préférence une ou plusieurs pompes péristaltiques permettant d'établir, dans les différentes canalisations, les débits, et donc, compte tenu des diamètres des canalisations, les vitesses désirées.

5 De façon avantageuse on peut utiliser, pour l'établissement de deux ou plusieurs des flux, une même pompe, par exemple, une pompe péristaltique à plusieurs canaux parallèles, de façon à assurer, y compris en cas de variation intempestive de débit de la pompe, une proportionnalité constante entre lesdits flux.

10 Bien entendu, si les quantités à traiter sont particulièrement importantes, l'agencement des canalisations selon l'invention peut être dédoublé, triplé ou multiplié, avec de préférence, des moyens d'établissement de flux, tels qu'une pompe, uniques ou plusieurs pompes solidarisées de façon à maintenir, en toute circonstance, une proportionnalité constante des flux dans chacune des
15 installations.

Le débouché d'une canalisation dans l'autre au niveau d'un point de rencontre peut s'effectuer selon un angle quelconque. Généralement on préfère que l'une des canalisations débouche sensiblement perpendiculairement dans l'autre mais on peut également incliner les axes des
20 débouchés.

De préférence on ne prévoit aucun moyen particulier d'homogénéisation tel que chicane ou obstacle dans la canalisation au niveau des points de rencontre ; ni de moyen de chauffage permettant d'atteindre de fortes températures (supérieures à 60°C).

25 De façon avantageuse, le dispositif selon l'invention peut comporter des moyens d'établissement et de contrôle des températures de façon à maintenir les sources dans les températures requises. Notamment pour la suspension cellulaire, l'installation peut être agencée de façon que la basse température soit maintenue non seulement dans la source mais également dans la première
30 canalisation jusqu'au point où débute la lyse.

Une installation selon l'invention permet, par exemple, de traiter un volume de suspension bactérienne de l'ordre de 1 à 5 litres par heure.

Le mélange obtenu en aval du premier point de rencontre présente une grande homogénéité pendant toute la durée du traitement, de même que le mélange neutralisé en aval du deuxième point de rencontre, de sorte que les moyens de séparation permettant de séparer, d'une part, les plasmides restant
5 en solution, et, d'autre part, les autres éléments cellulaires précipités ou floculés, travaillent dans des conditions constantes et contribuent à l'excellente reproductibilité de la préparation plasmidique purifiée finale.

Par ailleurs on améliore notablement le rendement final qui peut dépasser 50 mg de plasmide pour 100 g de bactéries.

10 D'autres avantages et caractéristiques de l'invention apparaîtront à la lecture de la description suivante, faite à titre d'exemple non limitatif et se référant au dessin annexé dans lequel la figure unique représente une vue schématique d'un dispositif de mise en œuvre du procédé selon l'invention.

La suspension bactérienne à lyser est une suspension provenant d'une
15 culture d'une souche de *E. coli* dans laquelle a été multiplié un plasmide tel que le plasmide pUC18 en tampon Tris EDTA avec une concentration bactérienne de l'ordre de 200 g (poids humide) par litre.

Le mélange soude-SDS est un mélange NaOH 0,2 M / 1 % SDS.

La solution d'acétate de potassium utilisée comme agent neutralisant est
20 à 3 M ; pH 5,5.

Le dispositif représenté sur la figure comprend un premier récipient 1 contenant la suspension bactérienne. A ce récipient sont associés des moyens de maintien à une température de l'ordre de + 4°C (non représentés) et des moyens d'agitation 2 permettant de maintenir l'homogénéité de la suspension.

25 A partir de la source 1 s'étend une canalisation souple en silicone ayant un diamètre interne de 2,06 mm et formant le premier tronçon de canalisation 3.

Le mélange soude-SDS est contenu dans un réservoir 4 à partir duquel s'étend une seconde canalisation, 5 de diamètre interne 3,17 mm et réalisée
30 dans le même matériau souple. A l'emplacement 6 où se trouve le premier point de rencontre la canalisation 3 débouche perpendiculairement dans la canalisation 5 de sorte qu'à cet emplacement se forme un mélange provoquant la lyse rapide des bactéries. A partir du point 6 s'étend un troisième tronçon de

canalisation, 7 jusqu'au point 8 formant le second point de rencontre, la longueur de la canalisation 7 étant de 0,8 mètres. Cette canalisation 7 présente un diamètre interne de 7 mm (modulable).

La solution d'acétate de potassium est contenue dans un réservoir 9 à partir duquel s'étend une quatrième canalisation 10 également en matière
5 souple ayant un diamètre interne de 2,79 mm débouchant dans la canalisation 7 au point de rencontre 8, également perpendiculairement à la canalisation 7.

Le récipient 9 est associé également à des moyens de maintien à basse température + 4°C.

10 A partir du second point de rencontre 8 s'étend une cinquième canalisation 11, formée par la suite de la canalisation 7, cette canalisation 11 aboutissant à un réservoir de récupération 12.

On comprend que les diamètres des trois canalisations 3, 5 et 10 sont dans des rapports tels que les proportions des sections internes des canalisations assurent, pour une même vitesse de circulation des liquides, les
15 proportions de mélange souhaitées.

En conséquence les canalisations souples 3, 5 et 10 peuvent passer à travers une pompe péristaltique unique 13 dont la partie rotative 14 assure l'établissement des flux dans les susdites proportions dans les trois
20 canalisations 3, 5 et 10.

L'établissement des débits dans les proportions souhaitées dans les canalisations 3, 5 et 10 détermine bien entendu la valeur des débits en aval dans les canalisations 7, et 11.

Les débits ainsi obtenus sont respectivement de 160 ml/min dans 7 et
25 244 ml/min dans 11.

Les bactéries sont soumises à l'action du mélange soude + SDS pendant toute la durée du trajet du liquide dans la canalisation 7, entre les points 6 et 8. Cette durée, dans l'exemple choisi, est de 15 sec.

On obtient finalement, dans le récipient de récupération 12, une
30 préparation lysée comprenant deux phases, à savoir une phase soluble claire contenant les plasmides, sensiblement exempte d'élément cellulaire et une phase supérieure insoluble contenant sensiblement les éléments cellulaires.

La séparation de ces deux phases est effectuée ensuite par des techniques classiques de filtration ou de centrifugation et la purification des plasmides peut encore être poursuivie selon les méthodes usuelles.

5 A titre de vérification on a procédé à une électrophorèse comparative des solutions de plasmide obtenues après lyse alcaline, soit en flux continu (comme décrit dans l'exemple ci-dessus) soit par agitation manuelle pendant 10 min (les quantités de bactéries utilisées dans les deux cas étaient similaires). La révélation du gel d'électrophorèse met en évidence la supériorité du procédé en continu dans la mesure où la teneur en plasmides est accrue et celle des
10 impuretés plus faible.

REVENDICATIONS

1. Procédé de lyse cellulaire selon lequel on réalise, en continu, un mélange liquide de cellules et d'un agent de lyse, et l'on fait immédiatement écouler
5 ce mélange sous flux constant à l'intérieur d'une canalisation, le débit de ce flux étant adapté, en fonction du diamètre et de la longueur de la canalisation, de manière à obtenir un lysat cellulaire sensiblement homogène à la sortie de ladite canalisation.
- 10 2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la canalisation présente un diamètre réduit facilitant l'homogénéisation très rapide du mélange.
3. Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, dans lequel ledit petit diamètre est de l'ordre de 1 cm ou inférieur.
- 15 4. Procédé selon la revendication 3, dans lequel ledit petit diamètre est 2 à 8 mm.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, dans lequel le mélange de
20 cellules et d'agent de lyse est réalisé en introduisant, dans la susdite canalisation, un flux d'une suspension de cellules et un flux d'une solution d'agent de lyse.
6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, dans lequel l'agent de lyse
25 est de nature alcaline.
7. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce que l'agent de lyse est un mélange soude/SDS.
- 30 8. Procédé selon la revendication 6 ou 7, dans lequel on ajoute un agent neutralisant au lysat cellulaire arrivant à l'extrémité de la canalisation.

9. Procédé selon la revendication 8, dans lequel l'agent neutralisant est de l'acétate de sodium ou de potassium.
10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, dans lequel l'agent de lyse
5 est une solution hypotonique.
11. Procédé d'extraction d'ADN plasmidique à partir de cellules contenant ledit ADN, dans lequel (i) on met en œuvre un procédé de lyse selon l'une des revendications 1 à 7 et 10 afin d'obtenir un lysat cellulaire, et en
10 continu du procédé de lyse, (ii) on traite le lysat cellulaire par un agent précipitant et/ou neutralisant, afin d'obtenir une préparation comportant un surnageant contenant l'ADN plasmidique et une phase précipitée ou floculée contenant la majorité des éléments cellulaires, y compris l'ADN génomique.
- 15
12. Procédé d'extraction selon la revendication 11, dans lequel :
- (i) on établit un flux de la suspension cellulaire dans une première canalisation ;
 - (ii) on établit un flux d'un agent de lyse dans une deuxième canalisation
20 qui se jette dans la première canalisation (ou vice-versa) en un premier point de rencontre pour former une troisième canalisation ;
 - (iii) on établit un flux d'un agent précipitant dans une quatrième canalisation qui se jette dans la troisième canalisation (ou vice-versa) en un deuxième point de rencontre situé en aval du premier
25 point de rencontre, pour former une cinquième canalisation ;
 - (iv) on établit un flux du mélange cellules / agent de lyse réalisé au premier point de rencontre, dans la troisième canalisation (comprise entre le premier et le deuxième point de rencontre) à un débit adapté en fonction du diamètre et de la longueur de la troisième
30 canalisation, de manière à permettre l'homogénéisation du mélange et l'obtention d'un lysat cellulaire sensiblement homogène au deuxième point de rencontre ; et

- (v) dans la cinquième canalisation, on établit un flux de la préparation obtenue au second point de rencontre, par mélange du lysat cellulaire avec l'agent précipitant ; et
- (vi) on récupère à la sortie de la cinquième canalisation une préparation comportant un surnageant contenant l'ADN plasmidique et une phase précipitée ou floculée contenant la majorité des éléments cellulaires, y compris l'ADN génomique.
13. Procédé selon la revendication 12, dans lequel la longueur de la canalisation entre le premier et second point de rencontre est de l'ordre de 10 cm à quelques mètres.
14. Procédé selon la revendication 11, 12 ou 13, dans lequel l'agent précipitant et/ou neutralisant est de l'acétate de sodium ou de potassium.
15. Procédé selon l'une des revendications 11 à 14, dans lequel (vii) on procède en outre à la séparation du surnageant d'avec la phase précipitée ou floculée, en continu de l'étape (vi) de récupération.
16. Procédé selon l'une des revendications 1 à 15, dans lequel les cellules sont des bactéries.
17. Procédé selon l'une des revendications 1 à 15, dans lequel les cellules sont des cellules eucaryotes.
18. Dispositif pour la mise en œuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 17, caractérisé en ce qu'il comporte,
- à partir d'une source de suspension cellulaire, telle qu'un réservoir, une canalisation permettant l'établissement d'un flux de suspension cellulaire,
 - à partir d'une source d'un agent de lyse telle qu'un réservoir, une deuxième canalisation permettant l'établissement d'un flux de l'agent de lyse, lesdites première et deuxième canalisations aboutissant à

un premier point de rencontre dans lequel elles débouchent l'une dans l'autre,

- une troisième canalisation de petit diamètre et de longueur déterminée s'étendant à partir dudit premier point de rencontre,
- 5 – et des moyens pour l'établissement des flux dans lesdites première, deuxième et troisième canalisations ;

la longueur, le diamètre et le débit dans ladite troisième canalisation étant adaptés de manière à obtenir un mélange sensiblement homogène aboutissant à un lysat sensiblement homogène.

10

19. Dispositif selon la revendication 18, caractérisé en ce qu'il comporte, en outre :

- à partir d'une source d'agent précipitant, telle qu'un réservoir, une quatrième canalisation aboutissant à un second point de rencontre à l'extrémité de ladite troisième canalisation de façon que les canalisations débouchent l'une dans l'autre, ladite troisième canalisation ayant une longueur déterminée par la distance entre ledit premier point de rencontre et ledit second point de rencontre,
- 15 – à partir dudit second point de rencontre, une cinquième canalisation de petit diamètre aboutissant à des moyens de récupération et/ou de séparation, et
- 20 – et des moyens pour l'établissement des flux dans lesdites quatrième et cinquième canalisations.

- 25 20. Dispositif selon la revendication 18 ou 19, dans lequel les moyens pour l'établissement des flux sont des moyens de pompage.

1 / 1

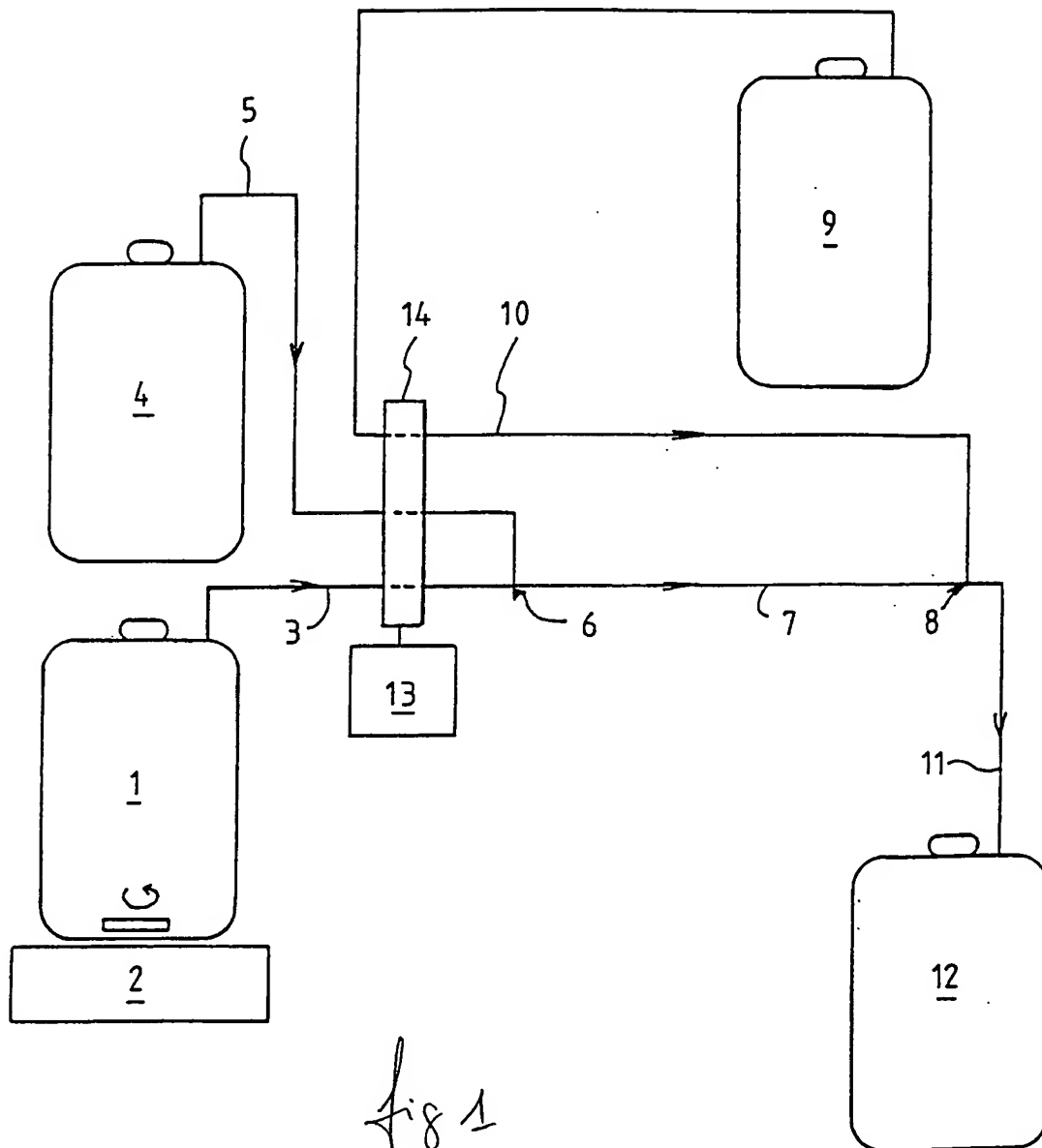


fig 1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No

PCT/FR 99/00105

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N1/06

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 294 824 A (JONES WILLIAM A ET AL) 13 October 1981 see column 4, line 29 - line 45; claims; figure 2 ---	1,18
A	WO 97 23601 A (GENZYME CORP) 3 July 1997 cited in the application see claims; example ---	1,7,14
A	US 5 096 818 A (DEBONVILLE DAVID A) 17 March 1992 ---	
A	DE 40 28 771 A (SOBOLEWSKI BERT) 21 February 1991 --- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 April 1999

Date of mailing of the international search report

22/04/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Coucke, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. lional Application No

PCT/FR 99/00105

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 96 02658 A (MERCK & CO INC ;LEE ANN L (US); SAGAR SANGEETHA (US)) 1 February 1996 see figure 1</p> <p>-----</p>	1,18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Jonal Application No

PCT/FR 99/00105

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4294824 A	13-10-1981	GB 1579120 A	12-11-1980
		AR 211931 A	14-04-1978
		AU 515950 B	14-05-1981
		AU 1661476 A	09-02-1978
		BE 844875 A	04-02-1977
		CA 1063019 A	25-09-1979
		DE 2635065 A	17-02-1977
		DK 350876 A	06-02-1977
		FI 762178 A	06-02-1977
		FR 2320106 A	04-03-1977
		IE 44378 B	04-11-1981
		IN 144537 A	13-05-1978
		JP 52018807 A	12-02-1977
		LU 75535 A	13-02-1978
		NL 7608651 A	08-02-1977
		SE 7608771 A	06-02-1977
		ZA 7604643 A	29-03-1978
WO 9723601 A	03-07-1997	AU 4607796 A	17-07-1997
		EP 0811055 A	10-12-1997
		JP 11500927 T	26-01-1999
US 5096818 A	17-03-1992	AU 7788591 A	31-12-1991
		WO 9118996 A	12-12-1991
DE 4028771 A	21-02-1991	DE 8911026 U	02-11-1989
WO 9602658 A	01-02-1996	AU 3126295 A	16-02-1996
		CA 2192342 A	01-02-1996
		EP 0771355 A	07-05-1997
		JP 10503086 T	24-03-1998

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De : de internationale No

PCT/FR 99/00105

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 6 C12N1/06

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 6 C12N C12M

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US 4 294 824 A (JONES WILLIAM A ET AL) 13 octobre 1981 voir colonne 4, ligne 29 - ligne 45; revendications; figure 2 ---	1,18
A	WO 97 23601 A (GENZYME CORP) 3 juillet 1997 cité dans la demande voir revendications; exemple ---	1,7,14
A	US 5 096 818 A (DEBONVILLE DAVID A) 17 mars 1992 ---	
A	DE 40 28 771 A (SOBOLEWSKI BERT) 21 février 1991 ---	
	--- -/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 avril 1999

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

22/04/1999

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Coucke, A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De: le internationale No

PCT/FR 99/00105

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>WO 96 02658 A (MERCK & CO INC ;LEE ANN L (US); SAGAR SANGEETHA (US)) 1 février 1996 voir figure 1</p> <p>-----</p>	1,18

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De: le internationale No

PCT/FR 99/00105

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 4294824 A	13-10-1981	GB 1579120 A	12-11-1980
		AR 211931 A	14-04-1978
		AU 515950 B	14-05-1981
		AU 1661476 A	09-02-1978
		BE 844875 A	04-02-1977
		CA 1063019 A	25-09-1979
		DE 2635065 A	17-02-1977
		DK 350876 A	06-02-1977
		FI 762178 A	06-02-1977
		FR 2320106 A	04-03-1977
		IE 44378 B	04-11-1981
		IN 144537 A	13-05-1978
		JP 52018807 A	12-02-1977
		LU 75535 A	13-02-1978
		NL 7608651 A	08-02-1977
		SE 7608771 A	06-02-1977
		ZA 7604643 A	29-03-1978
WO 9723601 A	03-07-1997	AU 4607796 A	17-07-1997
		EP 0811055 A	10-12-1997
		JP 11500927 T	26-01-1999
US 5096818 A	17-03-1992	AU 7788591 A	31-12-1991
		WO 9118996 A	12-12-1991
DE 4028771 A	21-02-1991	DE 8911026 U	02-11-1989
WO 9602658 A	01-02-1996	AU 3126295 A	16-02-1996
		CA 2192342 A	01-02-1996
		EP 0771355 A	07-05-1997
		JP 10503086 T	24-03-1998